

学校编码: 10384
学 号: 9926013

分类号:
UDC:

密级:

学 位 论 文

樱桃番茄作为口服疫苗载体可行性的初步研究

高 毅

指导教师: 夏宁邵 (研究员) 张军 (副研究员)

厦 门 大 学 生 命 科 学 学 院

申请学位级别: 硕 士 专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2002 年 8 月 论文答辩日期: 2002 年 8 月

学位授予单位和日期: 厦 门 大 学 2002 年 月

答辩委员会主席:

评阅人:

2002 年 8 月 日

摘 要

乙型病毒性肝炎是一种世界性的传染性疾病，而中国属于高流行区，92 年开始中国已将乙肝疫苗免疫列入计划免疫系统，对每个新生儿均要求进行乙肝疫苗接种初免，这同时也将是目前仍属于乙肝高发区的多数发展中国家和贫困地区发展的大趋势。目前我国首批新生儿乙肝免疫人群已历经 10 年，其中多数的血清抗体已降至较低水平，进行适当的免疫加强对于维持这批人群足够的血清抗体水平以维持对乙肝的免疫力具有重要的现实意义。对新生儿免疫而言，现有乙肝注射疫苗能起到很好效果，但对于加强免疫，由于进行疫苗注射需在特定的卫生机构进行，而且具有一定的痛苦，不易在人群中得到普遍接受。近年来发展出的植物口服疫苗为解决这一问题提供了新的思路。

本研究采用 CaMV35S 作为启动子，将乙肝病毒表面抗原小蛋白（HBsAg-S）基因和戊型肝炎病毒 ORF2 基因片段（HEV-NE2）分别插入植物双元表达载体微型 Ti 质粒 pCambia1301 和 pCambia1300 中，选择性标记基因为潮霉素磷酸转移酶基因，其中以 pCambia1301 为基础构建的表达载体带有 Gus 报告基因。

通过比较“紫皮”樱桃番茄子叶和胚轴对农杆菌的敏感性以及组培中的发芽率，最终选择子叶作为受体材料，其分化率和分化的不定芽的质量均明显优于胚轴。

对农杆菌转化条件的比较发现，菌株、共培养时间、共培养条件等均对转化有一定的影响。3 个菌株 LBA4404、EHA105 和 AGL1 中以 EHA105 浸染樱桃番茄的转化效率最高。共培养时间以 3 天为宜。经过脱菌处理后的材料应先恢复培养 1 周再加压筛选，有利于提高转化效率。

将带有 HBsAg-S 和 HEV-NE2 的微型 Ti 质粒通过农杆菌介导分别转入樱桃番茄中，经过加压筛选，分别获得 10 个转 p1301HBs 樱桃番茄株系、8 个转 p1301E2 樱桃番茄株系，转 p1300HBs 的抗性愈伤已开始分化抗性芽，而转 p1300E2 的樱桃番茄处在抗性愈伤阶段。获得的转化植株经 Gus 报告基因检测及 PCR、Southern 斑点杂交检测，证实目的基因已整合到樱桃番茄的基因组中。

ELISA 检测表明在转基因樱桃番茄中表达的 HBsAg 具有较好的免疫活性，比较了移栽苗根、茎、叶、果 4 个器官中，HBsAg 在叶子中表达水平最高，可达到 300ng/g 鲜重，果实中的表达量约在 10ng/g 鲜重左右。本实验较详细地比较了在不同种植条件下、不同植株及不同器官中目的蛋白表达水平的差异，并初步探讨了 Gus 报告基因与目的基因表达水平可能存在的不均一性。目前已获得转 HBsAg 的第二代樱桃番茄植株，并做了初步检测，叶片仍具有很强的 Gus 活性。

电镜下在经纯化的樱桃番茄植物蛋白提取液中可以观察到明显的圆形球状颗粒，其大小和天然乙肝病毒颗粒类似。

在用转 p1301HBs 的樱桃番茄进行的小鼠免疫实验中, 在经乙肝商用疫苗初免的小鼠抗体水平明显下降后, 3 只开始饲喂转基因植物组织 (约每天每只 1 μ g HBsAg), 2 只肌注纯化过的植物蛋白加强免疫 (约每只 0.6 μ g HBsAg), 在加强免疫 2-3 周后处理组小鼠均出现不同程度的抗体回升, 而阴性对照鼠未出现抗体回升, 结果表明口服和肌注都成功地诱导小鼠机体产生了特异性抗体回忆反应。

此外, 本研究还首次在植物中成功地表达了戊肝病毒基因片段 (HEV-NE2), 其表达量偏低, 但具有正常的免疫学活性。

樱桃番茄 (Cherrytomato) 是近年来新兴的小型蔬果, 其营养价值高, 可食性好, 被普遍作为生食水果, 具有发展为口服疫苗的良好潜力。本研究通过乙肝病毒表面抗原小蛋白 (HBsAg-S) 基因和戊型肝炎病毒 ORF2 基因片段 (HEV-NE2) 在樱桃番茄“紫皮”中的遗传转化研究, 建立了樱桃番茄的高效转化体系, 并通过动物免疫实验证实了樱桃番茄作为转基因植物口服疫苗载体的可行性, 为研究外源基因表达产物的免疫学活性, 实现利用樱桃番茄生产大量、廉价的蛋白疫苗提供了一些实验、理论指导。

关键词: 转基因植物 口服疫苗 樱桃番茄 乙肝病毒表面抗原小蛋白 (HBsAg-S) 基因 戊型肝炎病毒 ORF2 基因片段 (HEV-NE2)

Abstract

Hepatitis B virus infection is one of the most widespread viral infections of humans. China belongs to high epidemic area. Chinese government has listed HBV immune into planned immune system since 1992. Every newborn needs to accept HBV immune. And it is a development tendency in many areas of the developing world which belong to high epidemic areas of HBV, too. It is about 10 years since the first group of newborns accepted HBV planned immune. Serum antibody titers of most of them have descended to a lower level. They need to accept boost immune to maintain the antibody's protection function from viral infection. The existing intramuscular injection vaccine of rHBsAg results in effective immunization and protection in infants. For boost immune, however, because parenteral delivery needs to be administrated in special conditions and will cause some pain, it isn't easy to be accepted widely. In recent years, a novel production system of vaccines—"edible vaccines" or "oral vaccines" is being developed. Although the licensed HBV vaccines developed to date have been for parenteral delivery, there is no a prior reason to exclude oral delivery. Oral vaccines can serve multiple immunization priorities, including simplicity of use, increase in compliance (as a result of increased ease/comfort of delivery), enhanced immune responses at mucosal sites, and stimulation of humoral immunity.

Cherrytomato is a kind of novel fruit vegetable. It has high nutritious value and can be consumed raw. And the transformation system of tomato is easy. Thus cherrytomato is one of the ideal species for expressing subunit vaccine components.

The hepatitis-B surface antigen (HBsAg) gene linked with CaMV35S promoter was respectively inserted into mini Ti plasmids of the binary expression vector pCAMBIA1301 (containing hygromycin-resistant gene, kanamycin-resistant gene, Gus gene) and pCAMBIA1300 (containing Hyg^r gene, Kan^r gene, no Gus gene), to form the reconstructed plant expression plasmids (p1301HBs, p1300HBs). In the same way, the plant expression plasmids (p1301NE2, p1300NE2) carrying hepatitis-E virus open reading frame-2 (HEV-NE2) gene were constructed. Tested by restriction endonuclease analysis, these plasmids were directly introduced into three strains of *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404, EHA105, AGL1).

Sensitiveness to *Agrobacterium tumefaciens* and rate of caespitosa buds production were compared between the cotyledons and hypocotyls of breed "purple husk". The results showed that cotyledon was the better acceptor material and the buds coming from cotyledon have better quality.

Strains of *Agrobacterium tumefaciens*, time of co-culture and condition of co-culture can make some effect on efficiency of transformation. Among three strains of *Agrobacterium tumefaciens*, the cotyledon of cherrytomato is most sensitive to EHA105. And the suitable co-culture time is 3 days. After the procedure of killing *Agrobacterium tumefaciens*, the explants should be resumed for about 1 week, and then transferred to culture medium containing antibiotic. Resuming culture will do good to efficiency of transformation.

Mediated by EHA105, the mini Ti plasmids containing HBsAg and HEV-NE2 were transferred to cherrytomato. After 3-4months, many hyg-resistant plantlets were acquired. By far, we have got 10 stains of cherrytomato containing p1301HBs, 8 strains of cherrytomato containing p1301E2, and the hyg-resistant calli containing p1300HBs and p1300E2 respectively.

The presence and integration of target gene in transgenic cherrytomato was confirmed by hygromycin resistance, histochemical detection of Gus activity, polymerase chain reaction (PCR) and Southern dot blotting analysis. The immunological activity of recombinant HBsAg, HEV-NE2 was shown by ELISA. The expression of rHBsAg is better. The expression levels of rHBsAg derived from different organs of the same plant have been compared, and we found the expression level of rHBsAg in cherrytomato's leaf was highest. It can get to 300ng/g fresh weight. And the rHBsAg expression level in fruits was about 10ng/g fresh weight. In this study, the possibility the inequality of the expression levels between Gus gene and target gene has been discussed primarily, too.

Immunogenicity of rHBsAg derived from transgenic cherrytomato was confirmed by immunization of mice. Prime and boost in muscle injection with purified plant protein extracts extracted from transformed tissues and direct oral feeding with transformed tissues have been done respectively. The results showed that the effectiveness of boost is better than prime. After the serum antibody level of the mice administered parenteral prime with 2 μ g commercial HBsAg vaccine began to descend apparently, three of them began to be fed transgenic cherrytomato tissues (about 1 μ g HBsAg every day) and two was injected purified transgenic plant protein extracts (about 0.6 μ g HBsAg). After 2-3 weeks, all of these mice elicited strong secondary antibody response. The result of this animal immune test indicated the rHBsAg derived from transgenic cherrytomato has normal immunogenicity.

Through Electron micrograph, obvious round particles can be found in the purified transgenic plant protein extracts, and it is similar to HBsAg in nature.

By far, we have got the second generation of cherrytomato transformed p1301HBs, and strong Gus activity has be detected in its leaf.

In this study, we choose a new foreign breed of cherrytomato —“purple husk”. Through the research of transforming HBsAg gene and HEV-NE2 into cherrytomato, we have set up a high efficient transformation system of cherrytomato, and the recombinant protein from transgenic plants has been proved to have good immunogenicity. The results of this study indicated the feasibility of the production of oral vaccines by transgenic cherrytomato, and provided some theoretic and experimental directions for the production of large-scale, low-cost oral vaccines using transgenic cherrytomato.

Key words: transgenic plant, oral vaccines, cherrytomato, hepatitis B surface antigen (HBsAg), hepatitis E virus (HEV).

前 言

1. 疫苗的发展史

回眸医学发展的历程，疫苗的作用是功不可没的。十八世纪末，英国医生 Jenner 创制了牛痘苗，从而使天花从地球上销声匿迹，为预防医学开辟了广阔的途径。一百年后法国人 Pasteur 研制炭疽、鸡霍乱和狂犬病疫苗获得成功，使人们认识到疫苗将在人及家畜的某些疾病防治方面起到其他手段所不可比拟的作用。随着生物医学工程技术的突飞猛进，改造与创新使疫苗也从传统的针刺接种变化出许多面孔，科学家已经巧妙地利用治疗基因和蛋白质作为新武器，开发新型疫苗来征服各种传染性疾病。

传统上用于预防传染病的医用疫苗是血源性的减毒活疫苗和灭活病原体疫苗，如脊髓灰质炎病毒疫苗和乙脑病毒疫苗即属于减毒活疫苗，白喉疫苗和破伤风疫苗则属于灭活疫苗，前者若未充分减毒，可能使接种者发生临床型感染，从而引发本该由它们去预防的疾病；而过分灭活或减毒会影响疫苗的免疫原性，有可能达不到有效刺激宿主的免疫应答，难以获得可靠的免疫防护，故而人们迫切希望找到一种新的安全有效的疫苗。

随着生物技术的迅速发展，人们利用基因工程技术，从导致人畜疾病的病毒或细菌中分离出激发机体免疫反应的病原体基因，经重组改造后，再转到其它无害的生物体中，使之产生抗原蛋白，这种重组疫苗本身不会造成感染，如通过酵母表达系统生产的重组乙肝疫苗。但是这些重组亚单位疫苗的生产仍需特定的培养基、复杂的纯化处理、严格的无菌生产条件和特殊设施，并且需要冷藏保存运输和注射使用，因此重组疫苗的成本较高，限制了疫苗的全面使用。

一种理想的疫苗应该具备安全、有效、多价、成本低及保存使用方便等条件。20 世纪 90 年代初，世界卫生组织提出需要廉价、不需冷藏的疫苗之后，美国科学家 Charles J. Arntzen 提出了一个设想，即通过植物基因工程来生产疫苗。因为植物基因工程的发展已经使人们能够把重组的抗原基因作为外源基因导入植物体，并使其基因产物在植物的食用部位表达积累，人畜通过直接食用转基因水果或某种食品就可以获得抗原蛋白，从而使机体对该重组蛋白产生特异保护抗体，达到预防某种疾病的效果。这就是所谓的食用疫苗(edible vaccine)，或口服疫苗(oral vaccine)。从转基因植物的角度来看，植物性口服疫苗不过是转基因植物的一种手段，但在免疫学上则是提供了一种廉价安全的免疫方式。

2. 以植物反应器生产口服疫苗的优点

植物表达异源蛋白的应用前景表现于可大量生产治疗和诊断用抗体及生产某些动物疫苗，与微生物和动物反应器相比，植物表达系统在免疫原性、安全性、

来源和成本等方面都更具有潜在的优势。这具体表现在：

(1) 植物细胞的全能性。植物的组织、细胞及原生质体在适当条件下均能培养成一株完整的植物体。与动物细胞培养相比，植物细胞培养条件简单且易于成活，这有利于遗传操作。

(2) 用植物生产疫苗简单、方便。用动物和微生物生产，需要特殊的专业知识和贮藏条件，这对于第三世界国家有一定的困难。此外，这些生产系统还存在一些其他的弊端，例如，微生物培养基需要特殊处理，以消除致病的有害生物；同时细菌发酵常常产生一些不溶性的包涵体，将这些聚合物重新溶解并折叠成天然蛋白质，则需要一定的成本；而多数动物培养系统需要特定的生长培养基，还要特殊处理，系统生产力低。用植物生产则可克服上述弊端。植物种植是最经济的蛋白质生产系统。转基因植物易于在当地种植，所以不需要长途运送及冷藏，其种植不需要特殊技术，更不需要复杂的工业生产设施，只要有阳光、来自土壤或肥料的矿质营养及水，就能大规模产业化生产。因此，它能廉价生产高价值的、供不应求的蛋白。据计算，用普通方法生产 1g 抗体的成本为 2000—5000 美元，而用大豆生产 1000g 抗体只需 100 美元。

(3) 转基因植物中的外源基因可通过植物杂交的方法进行基因重组，进而可在植物体内积累多基因。

(4) 植物是能够大规模生产蛋白质的生产系统，这是利用植物能够贮藏蛋白质于种子中的这一有利条件。转化植株的种子易于贮存，有利于重组蛋白的生产和运输。

(5) 用可食性的植物表达重组蛋白，可增加其稳定性，以实现口服免疫，这将省去从植物中分离纯化重组蛋白的过程，大大降低费用。同时口服免疫避免了繁琐的接种过程，既降低成本又避免可能的交叉感染。

(6) 微生物系统不能对真核蛋白质进行准确的翻译后加工，而植物细胞具有与动物细胞相似的完整的真核细胞表达系统，有利于重组蛋白的正确装配和表达，完成如糖基化、酰胺化、磷酸化、亚基的正确装配等翻译后加工修饰，使其三维空间结构更趋于自然状态，使表达产物具有与高等动物一致的免疫原性和生物活性。

(7) 表达的免疫原无毒性和副作用，安全可靠，无残缺 DNA 和潜在的致病性。

(8) 常规疫苗在大规模细胞培养过程中，很容易发生病原性或非病原性细菌、病毒等污染，而转基因植物疫苗则不存在这个问题。用动物细胞生产基因工程疫苗，常用动物病毒作载体导入抗原基因，另外，生产过程中也可能污染动物病毒，这对人类可能造成潜在危险，而植物病毒不感染人类，所以用植物细胞生产重组蛋白更为安全。

(9) 与皮下注射免疫相比，转基因植物生产的亚基或可溶性抗原的口服免疫

常常在刺激免疫反应方面效率较高，而且只需要少量的抗原。由于免疫原有植物细胞壁的保护，不易被消化道的蛋白酶所降解，更易到达胃肠淋巴组织，通过与消化道内的粘膜接触，能有效地刺激粘膜免疫反应，进一步诱发全身性的体液免疫。

基于转基因植物口服疫苗所具有的上述优势，所以这个设想在上个世纪 90 年代初一经提出，便成为人们竞相研究的热点。1995 年，Anne Simon Moffat 在 Science 上指出，利用转基因植物开发新型疫苗是一种最经济有效的途径，从长远的观点出发，植物将有可能在未来的疫苗和药物市场上占较重要的地位⁽⁵²⁾。

3. 生产转基因植物疫苗的方法

利用转基因植物生产基因工程口服疫苗主要是将有中和表位的抗原基因导入植物，让其在植物中表达，人或动物直接摄入该植物或从其中纯化出的抗原蛋白质，能产生对该抗原的免疫应答，从而产生保护作用。

目前生产转基因植物口服疫苗的表达系统主要有两种：第一，稳定的整合表达系统，即用遗传转化的方法将抗原基因导入植物细胞，并稳定地整合在植物核基因组上⁽¹⁹⁾。其优越性在于：通过无性繁殖或有性繁殖可获得大量转基因植物的后代，并且通过杂交能够获得含多种抗原的多价复合疫苗。用于遗传转化的方法很多，目前转基因植物疫苗研究中用得较多的是农杆菌介导转化法。第二，暂态表达系统⁽⁷³⁾，即以植物病毒如烟草花叶病毒等作为表达载体转染植物细胞。植物病毒表达外源蛋白有两种方式：（1）通过病毒基因组启动子控制外源基因的转录；（2）将外源基因和病毒衣壳蛋白基因融合后包装入病毒，然后人工接种植物，病毒在植物体内能自我复制，这样目的抗原就在病毒衣壳中得到高水平的融合表达。抗病毒蛋白 α -天花粉病毒可以第一种形式在转染植物中高效表达⁽³⁴⁾，而颗粒形式存在的外源蛋白具有更强的免疫原性，因此与衣壳蛋白融合是一种更佳表达方式⁽⁷³⁾。与稳定整合表达系统相比，植物病毒表达载体具有不少优势：（1）病毒增殖速度快，利用嵌合病毒感染植物在短时间内就能获得高产量的外源蛋白，这是整合表达系统难以办到的；（2）植物病毒基因组很小，易于进行遗传操作；（3）植物病毒可以侵染单子叶等农杆菌的非寄主植物，扩大了基因工程的使用范围。因此这种生产方式是一条很有吸引力的途径。但是利用植物病毒构建融合抗原表达载体系统仍需考虑几个问题：首先是病毒载体的稳定性，在载体构建时要尽量避免出现同源序列，以防止发生基因重组；其次，外壳蛋白基因中插入外源核酸序列的容量有限，一般以 10-20 个氨基酸的多肽为宜，插入基因的分子量太大会影响病毒组装、复制和侵染能力，故在选择外源插入片段时，要对原抗原蛋白结构有充分了解，必须保证所选择的序列构成抗原决定簇；此外，由于外源基因并没有整合到植物基因组中，后代植物不能遗传得到外源基因，故每个寄

主植株都要重新接种病毒载体，所以暂态表达不易起始；生物安全性问题也应考虑，植物病毒载体侵染植物尤其是转基因工程病毒植株后，有可能与原来转移的基因作用而产生新的病原性病毒，引起生态上的危险，尽管这种危险性还未得到证实，但为了安全起见，必须在受控条件下进行实验操作，这在一定程度上也提高了成本；尽管植物病毒不会感染动物，但作为口服疫苗，植物病毒感染植物后所可能产生的一些有害物质是否会对动物或人体造成影响，这个问题也有待研究。

此外，在遗传转化途径上近年来又发展出叶绿体转化的方法。1988 年，Boynton 等首次成功地用野生型的叶绿体 DNA 转化了单细胞生物衣藻的突变体，证明植物叶绿体基因组是可以转化的⁽⁶⁾。随后一系列的研究结果表明，外源基因可以在叶绿体中得到稳定表达。叶绿体作为外源基因转化的受体具有诸多的优势⁽⁴⁴⁾：（1）便于外源基因定位整合；（2）基因为多拷贝，表达量高；（3）导入的外源基因性状稳定性高、安全性好；（4）能直接表达原核基因。（5）在叶绿体转化中，叶绿体的两个侧翼序列通过同源重组将外源基因插入叶绿体基因组功能基因之间的间隔区，从而使外源基因插入的位置精确，不会产生位置效应。此外在核基因组转化中普遍存在的基因沉默现象，在叶绿体转化中未曾见到。

4. 植物表达系统的选择

为了评估重组抗原的产量，植物系统的选择标准首先应该是在基因工程操作上的方便快捷。为此，在早期烟草被广泛应用⁽⁷⁹⁾，其生长周期短，但是由于在其叶片中含有高浓度的有毒生物碱，从烟草中提取的抗原如未经过严格的纯化，不能用于动物口服免疫的研究。

随后，一些科学家开始选择马铃薯作为研究材料，马铃薯的遗传转化较简单，而且现在已经获得块茎特异性启动子，他们发现在实验室环境下，只要经过几个月的转化过程就能得到转基因马铃薯块茎，用于动物实验，而且小鼠能生食马铃薯，但是其缺点是人类不能口服使用，熟食又可能会破坏蛋白质的免疫原性。

为了将口服疫苗更好地应用于人类疾病的防治，研究人员又发展了各种植物遗传转化技术，在人们喜爱的可生食果蔬中表达抗原蛋白。从 1995 年以来，利用转基因番茄、香蕉、莴苣生产口服疫苗的研究相继成功。香蕉作为世界上第四大水果，种植广，价格低，适合人类生食，是被广泛看好的转基因植物食用疫苗的生产材料。过去香蕉的遗传转化是一世界性的难题，但近年来也逐步被克服⁽⁴³⁾。此外，Clendenne 等已发现果实特异性启动子可以使外源基因在香蕉中特异表达

⁽¹¹⁾。

在动物疫苗植物载体的选择方面，尽管在早期研究中较难获得均一的转化体，苜蓿、谷类和豆类的优势仍是显而易见的。豆类和谷类植物广泛种植且产量

高，种子蛋白含量高，易于贮存，作为动物疫苗极适合饲喂免疫，但是其产生转化植物的时间和效率随种类而异，有些作物需要较长的周期才能获得有限的种子

(4)

5. 转基因植物疫苗免疫特点研究

近年来粘膜免疫接种已经引起高度重视。粘膜免疫系统既是机体系统免疫的重要组成部分，同时又具有其相对独立性。首先，粘膜是体内最大的免疫器官，在人体内的消化道、呼吸道及泌尿生殖道的内腔表面及一些外分泌腺都有一层粘膜，人体的粘膜系统表面积超过 400m^2 ，比皮肤的表面积大得多，是病原体进入身体的主要门户，人体粘膜免疫细胞占有所有免疫细胞的 80%，在粘膜免疫中发挥重要作用的 sIgA 的分泌量远远超过体液循环中 IgG 的含量，而且粘膜淋巴组织没有与年龄有关的官能障碍，因此粘膜免疫在机体免疫力方面占有非常重要的地位，它构成了机体抗感染的第一道防线，经粘膜途径接种疫苗可更加有效地诱导保护性免疫；其次，在一个粘膜部位如肠或鼻腔激活的部分淋巴细胞可以通过淋巴液进入血液循环迁移到远处，将免疫应答扩散到其他粘膜部位，发挥针对同一抗原的免疫反应，而与起始的诱导部位无关，这种粘膜免疫共享机制叫共同粘膜免疫系统(common mucosal immune system)⁽⁵⁰⁾，因此在一个粘膜部位接种疫苗即可预防其他粘膜感染；第三，虽然粘膜接种优先刺激粘膜部位的局部免疫应答，但也可有效的诱导全身性高滴度抗体应答和细胞毒 T 细胞应答，构筑起二重防御；第四，口服免疫可诱导 T 细胞介导的全身性免疫耐受，使机体免疫系统在接触某种抗原后产生对该抗原的特异性无应答状态，从而可望开发出口服抗炎疫苗，尝试预防和治疗自身免疫性疾病及过敏性疾病。最后，与注射疫苗相比，粘膜接种疫苗成本低，给药方便，安全性高，因此可望代替许多现行注射疫苗^{(86,}

87, 88)

在这类粘膜系统中，消化器官系统的面积约占 80%。肠道原本是消化系统的器官，令人惊奇的是它具有作为人体最大免疫脏器的功能，全部末梢淋巴结的 50%-60%都集中在肠道中。这些肠道内的淋巴结有派伊尔氏淋巴结(Peyer's patches)、肠间膜淋巴结，它们位于肠道上皮间、粘膜固有层等的肠道处，特别是小肠下段的回肠部，作为消化器官有关的淋巴组织控制着免疫应答。

粘膜免疫反应的诱导是从粘膜中特异的 M 细胞对入侵抗原的识别开始。M 细胞位于粘膜淋巴结的滤泡上皮中，例如小肠派伊尔氏淋巴结膜上就有丰富的 M 细胞。M 细胞摄取并将抗原引导进入粘膜下淋巴组织，在那儿抗原呈递细胞(APC)对抗原进行吸收加工，使抗原的表位呈现在 APC 表面，并在 T 辅助细胞的辅助和相关细胞因子的调节下，激活 B 细胞。活化的 B 细胞迁移到肠系膜淋巴结中，并在那里发育成熟为浆细胞。浆细胞迁移到粘膜表面分泌免疫球蛋白 IgA，IgA 分子在穿过粘膜上皮层向内腔分泌时，结合上膜结合分泌成分，形成分泌型 IgA

(sIgA)。SIgA 被运送到内腔后与特异性抗原表位发生反应，从而中和入侵的病原⁽⁷⁵⁾。sIgA 的诱生、游走和调节机理明显不同于全身抗体应答机理，但这种局部免疫实际上是全身免疫的一个组成部分，除体液免疫外，也包括局部的细胞免疫。

转基因植物疫苗的最理想的免疫途径是口服。口服免疫只需吞入，没有注射那样的痛苦，且不受医疗设施的限制。传统的注射免疫法，在全身系统（尤其是血液中）可诱导 IgG 等抗体，产生特异性免疫，但如果病菌的感染部位是肠道粘膜，就达不到理想的效果。而口服疫苗主要是经肠道免疫，与存在于肠道粘膜表面下淋巴组织中的免疫细胞发生反应，受到刺激的免疫细胞将信息传达至各部位，在诱导全身免疫的同时，又返回到原来的肠道，促使机体对抗原产生特异性抗体 sIgA。此类口服疫苗，能诱导全身系统和粘膜系统两大重要的免疫机体，构筑起二重防御。更具有意义的是在肠道受到刺激的淋巴结，不仅在肠道，而且在具有粘膜组织的身体各部分也有作用。应用亚单位疫苗或可溶性抗原进行口服免疫，其诱导免疫的效果较差，抗原用量大（毫克级水平）。况且发酵法生产的亚单位疫苗成本昂贵，难以推广应用。由于转基因植物可在其可食用部分表达抗原，因此可作为低廉的口服疫苗生产和输送系统。

但是口服免疫走向实用化还有许多课题有待解决。肠道免疫起主要作用的派伊尔氏淋巴结，大多存在于小肠下段的回肠部，必须使必要的抗原即疫苗不受强力消化酶的影响，也不会在具有很大表面积胃肠中扩散，使其顺利到达派伊尔氏淋巴结处。在这方面，以植物细胞作为载体的转基因口服疫苗具有很大的优势。此外，经过 1 次至数次服用，持续诱导产生 sIgA、血中 IgG 以及增强疫苗效果的最佳佐剂的开发，还有不诱导免疫耐受、仅诱导疫苗产生效果的抗原量的设定等，都是极为重要的课题。

许多文献报道了转基因植物疫苗在诱导机体系统免疫反应同时，可有效诱导机体粘膜免疫反应^(39, 24, 32)。

Brennan 等将嵌合植物病毒抗原通过粘膜途径免疫小鼠（鼻腔免疫和口服免疫）之后，不仅检测到了血清和粪便中的抗体，还收集了支气管、肠腔、生殖道的灌洗液进行检测，都发现了抗原特异性的抗体⁽⁷⁾。这是首次报道植物口服疫苗在没有佐剂情况下在远程的粘膜位点成功地诱导了粘膜免疫反应。

Modelska 等⁽⁵¹⁾将狂犬病毒抗原表位和苜蓿花叶病毒嵌合感染菠菜，之后通过皮下注射、胃部管饲和口服途径免疫小鼠。管饲抗原量是口服的 10 倍，发现口服免疫的小鼠产生的相应 IgA 抗体量是管饲小鼠的 2 倍，而且血清中都发现了 IgG 和 IgA。以减毒狂犬病毒攻击，免疫后的小鼠症状明显减轻。这说明用植物体口服免疫时，可能由于植物细胞壁的包裹及细胞膜的间隔作用，抗原能得到部分保护而不会被完全消化破坏，在口腔咀嚼过程中也可能由口腔粘膜吸收了部分

抗原。

6. 转基因植物疫苗的研究进展

1990 年,第一例利用植物表达系统生产口服疫苗的报告在国际专利合作公约(PCT)出现,Curtiss, R 等⁽¹²⁾首次报道了通过农杆菌介导的转化法在转基因烟草中表达链球菌变异株(S.mutans)表面蛋白(spaA),表达量占叶片总可溶性蛋白的 0.02%,小鼠口服转基因烟草组织后,可引起粘膜免疫反应,在唾液中发现分泌型免疫球蛋白 IgA(sIgA)。此后,用转基因植物生产口服疫苗成为植物基因工程研究的新热点。

6.1 乙肝病毒表面抗原(HBsAg)

乙型肝炎是危害全球人类健康最重要的传染病之一。乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)可刺激机体产生对乙肝病毒的保护性抗体,为现有商业疫苗的主要成分。1992 年,Mason 等⁽⁴¹⁾首次将乙肝病毒表面抗原(HBsAg)基因转入烟草中得到表达,目的蛋白约占总可溶性蛋白的 0.01%,纯化后的重组 HBsAg 经负染电镜观察,颗粒呈圆形,平均直径约为 22nm,具有免疫原性。其颗粒大小、浮力密度、免疫原性均与病人血清中及酵母重组的 HBsAg 类似,这表明外源基因在转基因植物中的转录和翻译没有遗传限制,不仅可以正常编码蛋白,而且可以组装,形成病毒样颗粒。Thanavala 等⁽⁶⁹⁾用从植物体中粗提的重组 HBsAg 对小鼠进行皮下注射免疫,其免疫反应与从酵母中得到的 HBsAg 类似,产生了 IgM 和各型 IgG。在抗乙肝病毒感染过程中,T 淋巴细胞介导的免疫反应起着关键作用。从免疫小鼠的淋巴结中分离出 T 淋巴细胞,在体外经烟草表达的 HBsAg 刺激后呈现增殖,这表明转基因植物表达的抗原保留了激发 B 细胞和 T 细胞免疫反应的抗原决定簇。

1999 年,Kapusta 等人将 HBsAg 基因片段导入羽扇豆及莴苣中整合表达,用转基因羽扇豆喂养小鼠,产生了 HBV 特异性抗体。三个自愿者生食转基因莴苣后,两个血清中产生了滴度较低的特异 IgG 抗体(10 IU/I),一个无反应⁽²⁹⁾。

2000 年,Richter 等又将乙肝表面抗原(HBsAg)基因转入马铃薯中得到表达,用薯块辅以霍乱毒素(CT)作为口服佐剂饲喂小鼠后,在小鼠体内检测到特异性抗体,三周后血清中抗体滴度达 73 IU/I,待抗体下降后用商用疫苗注射加强(亚免疫剂量),小鼠立即产生高水平的抗体回忆反应(1679 IU/I)。结果表明,口服和肠道外免疫结合有助于产生高水平的系统和局部的免疫反应。同时也表明,粘膜佐剂的使用能有效地增强免疫反应,甚至可能防止口服耐受的产生⁽⁵⁸⁾。

刘德虎等⁽⁸¹⁾在马铃薯中表达了乙肝病毒膜中蛋白抗原,用含有这种外源蛋白的马铃薯饲喂小鼠后,可在小鼠中检测到较高水平的乙肝病毒保护型抗体,达

10mIU 以上，通常这一滴度足以对人体产生保护作用。目前，转 HBsAg 基因的马铃薯口服疫苗正在进行 I/II 期临床试验，主要是作为商用疫苗的增强诱导剂。

此外，2000 年，Arntzen 小组在番茄中成功表达了 HBsAg，表达水平约为每 100g 成熟的果实中含 9 μ g HBsAg⁽³⁾。

6.2 霍乱弧菌霍乱毒素 B 亚基 (CT-B)

全球每年有 5 百万人感染霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 而引起霍乱，其中 20 万人死亡。Arakawa T. 等^(1,2)报道了霍乱毒素 B 亚单位 (CT-B) 口服植物疫苗研制结果。CT-B 是和肠道粘膜细胞表面特异的神经营苷脂结合而引起腹泻的。将 CT-B 基因导入马铃薯中，用其块茎口服免疫小鼠，在血清和肠道内检测到了特异抗体。当粘膜抗体水平下降后用马铃薯块茎强化免疫，抗体水平马上提高。毒性中和实验表明马铃薯口服疫苗诱导的特异性抗体可以中和 CT 的毒性。用 CT 接种经转基因马铃薯口服免疫后的小鼠，其肠道腹泻分泌液与对照组相比减少 60%。以上结果说明，转基因植物口服疫苗有可能成为一种预防细菌性内毒素疾病的有效手段。作者已申请并获准在自愿者身上进行人体免疫实验。

6.3 大肠杆菌热不稳定毒素 B 亚基 (LT-B)

肠毒性大肠杆菌 (*Enterotoxigenic E. coli*) 能分泌一种不耐热肠毒素 (LT)。LT 在结构、功能和抗原性上均与 CT 十分相似，含有 A 和 B 两种亚基，其中 B 亚基 (LT-B) 五聚体也能和肠粘膜上皮细胞表面的神经节苷脂结合，促使有毒性的 LT-A 进入细胞，促进肠液分泌，引起腹泻。这类细菌性腹泻是导致发展中国家的新生儿致死的主要原因之一。抗 LT-B 抗体能阻断 LT-B 和神经节苷脂的结合，减轻腹泻。

1995 年，Haq 等⁽²⁴⁾将 LT-B 基因分别导入烟草和马铃薯，并用 ELISA、免疫沉淀技术等方法在转基因烟草叶片和马铃薯块茎的提取物中检测到了 LT-B 的表达。他们发现在 LT-B 的 C 末端加入微粒体滞留序列 (Ser-Glu-Lys-Asp-Glu-Leu) 后，转基因烟草中的目的蛋白含量与总可溶性蛋白的比值由原来的 5 μ g/g 升至 14 μ g/g，而转基因马铃薯中比值则由 30 μ g/g 升至 110 μ g/g。经凝胶色谱和与神经节苷脂亲和力的分析，发现植物来源的 LT-B 可装配成五聚体的环状结构，并能特异地结合神经节苷脂。口服实验表明，烟草来源的 LT-B 能刺激小鼠产生体液和粘膜反应，它诱导的抗体能中和 LT 的毒性。此外，用转 LT-B 基因的马铃薯饲喂小鼠，每次喂 5g 块茎样品，四次后小鼠也产生了粘膜和血清抗体。

1998 年，Mason 等⁽⁴⁰⁾根据植物密码子偏嗜性人工合成了适合于植物表达的不耐热肠毒素 B 亚基 (LT-B) 基因，并导入马铃薯中表达。他们分析了细菌来源的 LT-B 基因，发现其中有一些密码子和序列会导致基因在植物中表达量低下或表

达产物过早降解。根据植物密码子偏嗜性人工合成的基因与细菌来源 LT-B 基因相比,产量提高了 3-14 倍。植物来源的 LT-B 能装配成五聚体颗粒并能和神经节苷脂结合。直接用转基因马铃薯块茎 5g (约合 20-50 μ gLT-B) 饲喂小鼠,30 天后发现其血清及粘膜中特异性抗体水平比用 5 μ g 大肠杆菌重组 LT-B 管饲免疫的对照组小鼠要高。用 25 μ gLT 毒素口服攻击接种免疫后的小鼠,虽然所有的小鼠都产生了中毒症状,但高剂量马铃薯免疫的小鼠中毒症状比对照组明显要轻。

Lauterslager 等⁽³⁵⁾在表达载体构建时进行了一些优化,在 LT-B 的 3' 端加入一段编码六肽 (Ser-Gln-Lys-Asn-Gln-Leu) 的核苷酸序列,提供了蛋白质滞留于内质网的信号,同时使用了块茎特异性启动子,通过农杆菌介导在转基因马铃薯块茎中表达的 LT-B 达 13 μ g/g 鲜重,以其块茎提取液皮下注射小鼠,在血清中检测到高滴度抗体,和大肠杆菌表达的重组 LT-B 同样具有较强的免疫原性。用块茎抽提液混合佐剂皮下初免小鼠,以未初免的小鼠作为对照组,每天均饲喂 5g 新鲜块茎组织 (相当于 65 μ gLT-B),或是管饲 0.4ml 块茎抽提液 (相当于 2 μ gLT-B),结果表明不论是直接饲喂还是管饲,只有在初免过的小鼠血清和粪便中能检测出抗 LT 的 IgA 抗体。他们的研究表明,管饲抽提液比直接饲喂块茎的效果好。

1997 年,美国 FDA 批准了第一例人体临床试验⁽⁶⁷⁾。研究人员将 LT-B 基因导入马铃薯中表达,并将转基因马铃薯不同株系的块茎切成小块,混匀后分成 50—100 g/份,以消除不同转基因株系表达量不同而带来的影响。14 名自愿者被分成高、低剂量两组,实验组 11 名生吃转基因马铃薯,对照组 3 名生吃非转基因马铃薯。在吃之前及消化吸收过程中的多个时间取血清及粪便检测其中的 LT-B 特异抗体 IgG 和 IgA。发现实验组 11 人中有 10 个体内抗 LT-B 抗体有显著升高。而对照组均没有检测到 LT-B 特异抗体。结果表明,对食用转基因 LT-B 疫苗的反应,个体间存在显著差异。此外,还初步发现增加食用土豆剂量 2-3 倍,并没有相应的增强免疫反应的作用。口服转基因马铃薯免疫后的自愿者经致病性大肠杆菌 (毒力滴度为 10^6 ,足以引起严重腹泻的剂量) 攻击,机体不受影响。该临床试验表明,转 LT-B 马铃薯口服疫苗能够经受消化并诱导人体产生免疫反应。

最近,有报道称 LT-B 也在玉米中获得高水平表达,转基因玉米种子通过动物实验证实能产生保护性的免疫反应⁽⁶²⁾。

6.4 诺沃克病毒衣壳蛋白 (Norwalk virus capsid protein, NVCP)

诺沃克病毒 (Norwalk virus, NV) 是一种胃肠病毒,可引起流行性急性胃肠炎。1996 年, Mason 等⁽³⁹⁾研究了 NVCP 在转基因烟草和土豆中的表达及其口服免疫原性,发现在转基因植物中表达的 NVCP 与用重组杆状病毒感染后的昆虫细胞中表达的 NVCP 具有相似的物理学特性。在转基因烟草的叶浸提物中, rNVCP

也可组装成病毒样颗粒 (VLPs), 电镜下观察为空心的球形, 大小和形态与杆状病毒在昆虫细胞中所表达的无区别, 直径为 38nm, 在蔗糖梯度离心及 SDS/PAGE 中其物理特征与杆状病毒在昆虫细胞中表达的重组蛋白也相似。rNVCP 在叶中的表达量最高可达可溶性蛋白的 0.23%, 在土豆块茎中可达 0.37%。用从叶中浸提的 rNVCP 灌服小鼠进行口服免疫试验, 可产生特异性血清 IgG 和粘膜分泌性 IgA 抗体, 而用表达 rNVCP 的土豆块茎直接饲喂小鼠, 也可在其血清中检测到特异性 IgG。研究表明 VLPs 可耐受肠道内的酸性环境, 比自由的亚单位更加稳定, 并且具有较强的免疫原性。需要说明的是, 免疫后 40d 检测抗体时, 灌服鼠血清 IgG 抗体产生率较高, 近 90%, 而粘膜 IgA 的产生率较低, 约 60%; 直接饲喂的小鼠, 血清 IgG 抗体产生率只有 40%, 粘膜 IgA 抗体产生率才 10%。这种低反应性原因可能是由于灌胃可使小鼠一次性服用大量抗原, 而饲喂则少得多, 此外, 饲喂的抗原多经历了从口到胃这段消化道的消化, 蛋白有所降解。

6.5 狂犬病病毒 (RV) 糖蛋白

1995 年, McGarvery 等⁽⁴⁶⁾在转基因番茄中表达了狂犬病毒 (RV) 糖蛋白, PCR 和 Northern blot 分析证实了转基因番茄的叶和果实中产生了正确的 RNA 分子, 用 Western blot 同样在叶片和果实中检测到了糖蛋白的存在。通过免疫金标记的叶片组织的电镜观察和狂犬病病毒糖蛋白的特异抗血清实验表明, 糖蛋白主要定位在高尔基体、囊泡、胞质膜和叶片维管束薄壁细胞的细胞壁。在 BHK 细胞中生长的病毒中糖蛋白呈现为 66kDa 的分子簇, 而在番茄中表达的糖蛋白则呈现 62 和 66kDa 两种大小的分子簇。野生的糖蛋白分子聚集后可转变成一种和番茄叶片提取的糖蛋白很相似的形式, 表明转基因植物可以对外源重组蛋白进行翻译后糖基化修饰。并且植物积累的低水平糖蛋白能与单克隆抗体中和。1997 年, Yusibov 等⁽⁷⁸⁾用 RV 糖蛋白多肽 (& 爱滋病毒抗原) 与苜蓿花叶病毒衣壳蛋白融合的植物疫苗注射小鼠诱导产生出中和抗体。实验结果表明, 不论是腹腔免疫还是口服 (管饲或直接饲喂病毒感染的菠菜叶), 均能引发局部和系统免疫反应。在腹腔免疫 3 次后, 40% 的小鼠能够抵抗致死剂量的狂犬病毒的攻击。口服抗原能刺激血清中特异性 IgG 和 IgA 的产生, 并缓解由于鼻腔感染狂犬病弱毒株而引起的临床症状。这个报道还揭示出未纯化的植物疫苗比纯化后的具有更强的免疫反应。

此外, 流感病毒&艾滋病毒融合抗原⁽⁶³⁾、麻疹病毒抗原⁽²⁷⁾、人巨细胞病毒 (CMV) 糖蛋白 B⁽⁶⁶⁾、疟疾抗原⁽⁷³⁾等已借助农杆菌介导或病毒载体介导在植物中表达成功。

迄今为止, 除人体疫苗外, 还在植物中表达了多种具有免疫活性的动物疫苗。

以下将近年来在植物中表达的人和动物疫苗的部分研究进展综合如表。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库